

Process for coating acousto-electric sensor with protein

Patent number: DE4418926
Publication date: 1996-02-08
Inventor: RAPP MICHAEL DR (DE); WESSA THOMAS (DE)
Applicant: KARLSRUHE FORSCHZENT (DE)
Classification:
- **international:** B05D5/00; G01N29/00; C08F122/40; C09D179/08;
C09D189/00; C07D209/48
- **europaean:** C09D179/08, G01N33/543K2, G01H13/00
Application number: DE19944418926 19940531
Priority number(s): DE19944418926 19940531

Abstract of DE4418926

Process for coating acousto-electric sensors with proteins comprises (a) applying a silane-contg. promoter layer; (b) bonding a polyimide layer to the promoter layer; (c) heat-treating the two layers; (d) generating terminal amino gps. on the polyimide layer, and (e) binding activated proteins to the terminal amino gps.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 44 18 926 C 1

21 Aktenzeichen: P 44 18 926.5-45
22 Anmeldetag: 31. 5. 94
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 8. 2. 96

51 Int. Cl.⁶:
B 05 D 5/00
G 01 N 29/00
C 08 F 122/40
C 09 D 179/08
C 09 D 189/00
// C 07 D 209/48

DE 44 18 926 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 76133
Karlsruhe, DE

72 Erfinder:

Rapp, Michael, Dr., 69117 Heidelberg, DE; Wessa,
Thomas, 67346 Speyer, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 03 61 729 A2

54 Verfahren zum Beschichten akustoelektrischer Sensoren

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Beschichten akustoelektrischer Sensoren mit Proteinen, wobei die hydrophile Oberfläche des Sensors funktionalisiert wird. Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines Sensors zur Verfügung zu stellen, der einen empfindlichen, rauscharmen und hochspezifischen Nachweis von Biomolekülen in wässriger Lösung erlaubt. Gelöst wird diese Aufgabe durch Aufbringen einer silanhaltigen Promoterschicht, Anbinden einer Polyimidschicht an die Promoterschicht und Tempern der beiden Schichten, Erzeugung von endständigen Aminogruppen auf der Polyimidschicht und Anbindung von aktivierten Proteinen an die endständigen Aminogruppen.

DE 44 18 926 C 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Beschichten akusto-elektrischer Sensoren nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

Es gibt bislang einige etablierte analytische Verfahren um auch Biomoleküle zu analysieren, die sich aber meist aufwendiger und teurer Labormethoden bedienen (HPLC, GC-MS). Eine preisgünstige Alternative zu der hier beschriebenen Methode stellen hingegen die sogenannten Immunoassays dar. Diese basieren ebenfalls auf der Bindung eines Analyten an einen Antikörper, benutzen aber zwangsläufig ein indirektes Verfahren für den Nachweis dieser Bindung. Dabei wird der Probe ein radioaktiv-, fluoreszenz- oder enzymmarkiertes analyt-analoges Molekül zugesetzt, das mit dem Analyt um die Antikörperbindestellen konkurriert. Zur Auswertung ist damit ein Verfahren nötig, das aus mehreren Reagenzienzuführ-, Inkubations- und Waschgängen besteht; die Gesamtzeit pro Assay beträgt typischerweise eine Stunde. Eine Verwendung der On-line-Methode ist damit ausgeschlossen.

Darüber hinaus wurden weitere Immunosensorprinzipien in der Literatur beschrieben. Nach Meinung vieler Autoren weichen sie immer noch stark von der Idealvorstellung eines preisgünstigen, genügend empfindlichen zukünftigen Immunosensors ab: In mehreren Übersichtsartikeln wurden solche Methoden bereits aufgrund ihrer hohen Kosten (Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, Gitterkoppler, Differentielles Interferometer) bzw. wegen ihrer niedrigen Empfindlichkeit (Potentiometrischer Immunosensor) kritisiert, während der Immunosensor auf Oberflächenwellen (OFW)-Basis bislang favorisiert wurde.

Aus der EP 0 361 729 A2 ist ein Verfahren der e. g. Art zur Erzeugung eines Sensors bekannt, welcher eine Schutzschicht zur räumlichen Trennung von Substrat und wäßriger Analytlösung aufweist. Dieser Sensor weist bei einer Arbeitsfrequenz > 100 MHz Dämpfungen zwischen 30 und 40 dB auf, wodurch eine hohe Störanfälligkeit bei starkem Rauschen verursacht wird.

Aufgabe der Erfindung ist es nun, ein Verfahren zur Herstellung eines Sensors zur Verfügung zu stellen, der einen empfindlichen, rauscharmen und hochspezifischen Nachweis von Biomolekülen in wäßriger Lösung erlaubt.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Die Unteransprüche beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens.

Der verfahrensgemäße Sensor ermöglicht die spezifische Messung der Anwesenheit bzw. der Konzentration verschiedener Biomoleküle wie Proteine, Enzyme sowie komplexerer Makromoleküle — Teile des Erbgutes (DNS, RNS) oder verschiedene Krankheitserreger (z. B. Viren oder Bakterien) — durch Direktnachweis der Bindung an spezifische Antikörper in wäßrigen Lösungen. Mit dieser Methode sind damit keine zeitaufwendige Verfahren mehr notwendig, die auf die Konkurrenz zwischen gelabelten und ungelabelten Analyten beruhen (indirektes Nachweisverfahren bei Immunoassays).

Bei dem Sensor handelt es sich um einen massensensitiven Sensor, der die bei der Sorption des Analyten verursachten Schallgeschwindigkeitsänderung von akustischen Oberflächenwellen (OFW) nutzt, um auf die sorbierte Masse des Analyten und somit auf dessen Anwesenheit bzw. Konzentration in der Lösung zurückzuschließen.

Um eine analytenspezifische Sorptionsreaktion zu erhalten, sind selektive Beschichtungen auf dem OFW-Substrat notwendig. Besondere Flexibilität ist hierbei dann gewährleistet, wenn diese Beschichtungen aus Antikörpern bestehen, zumal sich diese gegen beliebige — in der klinischen Diagnose relevante — Makromoleküle kostengünstig herstellen lassen. Bei dem erfindungsgemäßen Sensor handelt es sich also um einen echten Immunosensor der seine Daten in-situ ermittelt und damit eine echte On-line-Meßmethode für Bioanalytik ermöglicht.

Gegenüber der herkömmlichen Bioanalytik bietet der Sensor eine Reihe von Vorteilen:

- Kostengünstig: 4 — 10 DM pro Stück
- Empfindlichkeit wie Bio-Assay
- auf beliebige Biosysteme übertragbar.
- Sensoren, die mit einer Polyimidschicht passiviert wurden, zeigen eine sehr gute Langzeitstabilität. Die Eigenschaften der Sensoren, Dämpfung an Luft und in Wasser sowie die Phasenlage, ändern sich auch nach Monaten nicht.
- Es ist möglich passivierte Sensoren mehrere Stunden mit 0.1 m Salzsäure zu behandeln, ohne daß die Interdigitalstrukturen angegriffen werden.

Außerdem bietet die Passivierung mit Polyimid den Vorteil, daß es nun möglich ist die Oberfläche nach einer Behandlung wieder zu regenerieren.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Beispiels und der Figuren näher erläutert.

Die Fig. 1 zeigt die Struktur eines Polyimids.

Die Fig. 2 zeigt die Anbindung des Polyimids an hydrophile Oberflächen.

Die Fig. 3 erläutert die Regenerationsfähigkeit eines Sensors und

Fig. 4 zeigt den Verlauf einer Immunoreaktion.

Passivierung mit Polyimid

Bei den käuflich erhältlichen akustischen Bauelementen (Schwingquarze, SAW's, Scherwellenmodule) sind die Interdigitalstrukturen häufig aus Aluminium. Betreibt man nun solche Bauelemente in wäßrigen Lösungen, so altern die Aluminiumstrukturen und ein Bauteil hat nur eine begrenzte Lebensdauer von einigen Tagen. Will

man zudem solche Devices als Biosensoren verwenden bedeutet dies, daß die Oberfläche einer Immobilisationsprozedur unterzogen wird, die im allgemeinen chemische Bedingungen mit sich bringt, die die Aluminiumelektroden angreifen. Aus diesem Grund wurde eine Passivierungsmethode zum Schutz der Interdigitalstrukturen entwickelt, die eine chemische Resistenz bei fast unveränderten physikalischen Eigenschaften liefert.

Aus der Halbleitertechnik ist eine Passivierung bzw. Isolierung von Mikrostrukturen mit Polyimid hinlänglich bekannt, dessen Vorteile vor allem in der guten Kantenüberdeckung liegen. Die fertigen Monomermischungen, ein Polyimid entsteht immer aus einem Säuredianhydrid und einem Diamin, sind käuflich erhältlich. Das von uns ausgewählte Polyimid bildet sich aus den Monomeren 3,3',4,4'-Biphenyl-Tetracarboxyl-Dianhydrid und p-Phenyl-diamin (Fig. 1). Dieses Polyimid zeichnet sich durch Säureresistenz bei dünnen Schichten aus und ist somit ideale Ausgangsbasis für Immobilisationsmethoden, die pH-Wertänderungen bedingen.

Die entwickelte Passivierungsprozedur ist nun im folgenden beschrieben:

Waschen der Sensoren

Die Sensoren werden 10 sec mit Aceton bedeckt und anschließend wird das Aceton bei 2000 rpm 10 sec lang abgeschleudert (Spin Coating).

Ansetzen und Aufbringen des Promoters

50 µl Promoter werden mit 95 ml Methanol p. a. sowie 5 ml bidestilliertem Wasser gemischt und ca. 15 min gerührt. Die angesetzte Lösung wird 12 h stehen gelassen und ist gekühlt (4°C) etwa 20 Tage haltbar.

50 µl der Promoterlösung werden auf den Sensor gebracht und 30 sec einwirken lassen. Anschließend wird der Promoter bei 3000 rpm 30 sec lang abgeschleudert.

Ansetzen der Monomermischung

In einem 10 ml Kolben werden pro 1 ml 1-Methyl-2-Pyrrolidon 0.95 g Monomermischung eingewogen und die Lösung wird dann unter Kühlung (Eisbad) ca. 15 min gerührt.

Aufbringen der Monomermischung

50 µl Monomermischung wird auf den Sensor pipettiert und 70 sec lang einwirken gelassen. Nach dieser Zeit wird die überschüssige Monomermischung 30 sec lang bei 5000 rpm abgeschleudert.

Tempern

Der beschichtete Sensor wird in einen nicht vorgewärmten Temperofen gebracht. Von Raumtemperatur wird auf 200°C hochgeheizt; ist diese Temperatur erreicht, wartet man 30 min (Polymerisation) und heizt anschließend 30 min lang auf 350°C hoch (Wasser wird verdampft). Nach dem Tempern wird der beschichtete Sensor auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Polymerisation verläuft dabei in zwei Stufen, wie die Fig. 1 schematisch zeigt. Zunächst bildet sich aus den Monomeren ein sekundäres Amin, das bei 200°C Wasser abspaltet und zum Polyimid reagiert. Erhöht man anschließend die Temperatur auf 350°C so wird das entstandene Wasser aus der Polymermatrix abgedampft.

Die Anbindung des Polyimids an hydrophile Oberflächen, welche OH-Gruppen enthalten, geschieht, wie in Fig. 2 schematisch dargestellt, durch einen käuflichen Promoter, der Aminopropyl-Triethoxy-Silan enthält. Es können alle Promotoren auf Silanbasis verwendet werden, welche mindestens eine Ethoxygruppe und mindestens eine primäre Aminogruppe enthalten. Der Promoter wird vor der Polyimidbeschichtung auf die Oberfläche gebracht und bei der Reaktion kann nun das Silan mit seiner endständigen Aminogruppe in die Polymerisation eingreifen, indem es an Stelle des Diamins eine Imidbindung mit dem Dianhydrid eingeht.

Das Silan fungiert also anschaulich als Spacer zwischen der Oberfläche des Substrats und dem Polyimid.

Die Passivierung mit Polyimid bietet den Vorteil, daß die Sensoroberfläche regeneriert werden kann. Die obere Abbildung in Fig. 3 zeigt dies am Beispiel einer unspezifischen Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA) an einer Sensoroberfläche. Es ist möglich die adsorbierten Makromoleküle innerhalb kurzer Zeit mit 0.1 M Salzsäure wieder abzulösen, ohne dabei die Sensoroberfläche anzugreifen.

Die untere Abbildung zeigt die Reproduzierbarkeit der Adsorption nach einem solchen Reinigungsschritt.

Die passivierte Oberfläche wird nun wie folgt funktionalisiert:

Auf der Basis einer polyimidierten Sensoroberfläche wurde nun eine Immobilisationsmethode gesucht mit der es möglich ist ein biologisches Makromolekül an den Sensor kovalent zu binden. Dafür geeignet war die Aktivierung mit Bromcyan in Form der Cyanotransfertechnik.

Die Funktionalisierung der Oberfläche mit Bromcyan wird häufig zur Aktivierung von Harzen verwendet. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Cyanotransfertechnik, die mit Triethylamin den Angriff des CN⁺ katalysiert.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden im folgenden beschrieben:

Lösen von 1 g BrCN in 10 ml Aceton

Lösen von 1,52 g Triethylamin (Puffersubstanz) in 10 ml Aceton

Waschen mit

— Wasser (20 min)

— Wasser : Aceton = 7 : 3 (20 min)

— Wasser : Aceton = 4 : 6 (20 min)

Reaktionsmedium ist ein Gemisch aus Wasser : Aceton = 4 : 6

Reaktionsmischung wird unter Rühren auf -15°C gekühlt.

Zu den Sensoren werden 10 ml BrCN-Aceton-Gemisch innerhalb von 2 min zupipettiert, danach erfolgt die Zugabe der gleichen Menge von Triethylamin-Aceton-Lösung, ebenfalls innerhalb von 2 min.

Anschließend werden die Sensoren in Wasser überführt und dort 24 Stunden aufbewahrt (Hydrolyse).

Durch die Hydrolyse entsteht auf der Sensoroberfläche eine endständige Aminogruppe an die ein Antikörper mit seiner endständigen Carbonsäuregruppe kovalent anbinden kann. Hierfür ist es nötig diese Carboxylgruppe in geeigneter Weise zu aktivieren.

Zur Aktivierung des Antikörpers wird eine 0.5 molare N-Ethyl-N'-Dimethyl-Aminopropyl-Carbodiimidlösung verwendet. 5 ml dieser Lösung werden mit 100 μl monoklonalen Antikörper gemischt und anschließend mit der funktionalisierten Oberfläche zur Reaktion gebracht. Das Carbodiimid kann in Wasser gelöst werden, wobei sich ein pH = 10 einstellt, besser ist allerdings Puffer als Reaktionsmedium, dann ändert sich der pH-Wert bei der Aktivierung nicht (pH = 7).

Der so vorbehandelte Sensor kann außer mit Antikörpern auch mit anderen Proteinen wie Antigenen, Albuminen, Pflanzenproteinen und Protein A beschichtet werden.

In Fig. 4 ist die Immunoreaktion eines Antikörpers mit einem Antigen, exemplarisch an dem Beispiel anti-Glucoseoxidase und Glucoseoxidase, gezeigt. Beprobt man den Sensor, der mit Antikörper beschichtet ist mit Antigen, so erhält man eine irreversible Frequenzänderung. Bei einem Referenzsensor, der nicht mit Antikörper behandelt wurde, aber mit der Bromcyanprozedur aktiviert und mit Rinder Serumalbumin beschichtet war, findet man nur eine geringe reversible Signaländerung (oberer Teil der Figur).

Die beiden unterschiedlichen Aktivierungen des Antikörpers haben verschiedene Aktivitäten des Proteins zur Folge. Fig. 4 zeigt im mittleren Bild eine Immunoreaktion bei der die Aktivierung des Antikörpers in wässriger Lösung abläuft. Diese Immunoreaktion ist mit einer Frequenzänderung von 40 kHz verbunden. Geschieht die Aktivierung des Antikörpers im gepufferten Medium mißt man eine Frequenzabnahme von 200 kHz. Dies bedeutet, daß der Antikörper durch ungepufferte Behandlung angegriffen wird und deaktiviert, wodurch weniger Antigen gebunden werden kann.

Das beschriebene Verfahren eignet sich besonders für die Beschichtung folgender Sensortypen:
Oberflächenwellenbauelemente mit horizontalpolarisierten Scherwellen,
Oberflächenwellenbauelemente mit Rayleighwellen,
Schwingquarze und
Plate-Wave-Sensoren.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Beschichten akustoelektrischer Sensoren mit Proteinen, wobei die hydrophile Oberfläche des Sensors funktionalisiert wird, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) Aufbringen einer silanhaltigen Promoterschicht,
- b) Anbinden einer Polyimidschicht an die Promoterschicht und tempem der beiden Schichten,
- c) Erzeugung von endständigen Aminogruppen auf der Polyimidschicht und
- d) Anbindung von aktivierten Proteinen an die endständigen Aminogruppen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Promoterschicht aus Silan mit mindestens einer Amino- und mindestens einer Ethoxygruppe besteht.

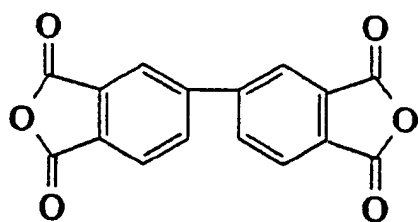
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Schichten verursachte Dämpfung kleiner ist als 3 dB.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyimidschicht durch Bromcyan funktionalisiert wird und durch anschließende Hydrolyse eine endständige Aminogruppe erzeugt wird.

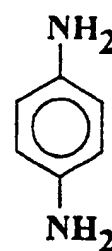
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Struktur des Polyimids PI 2610

Fig. 1

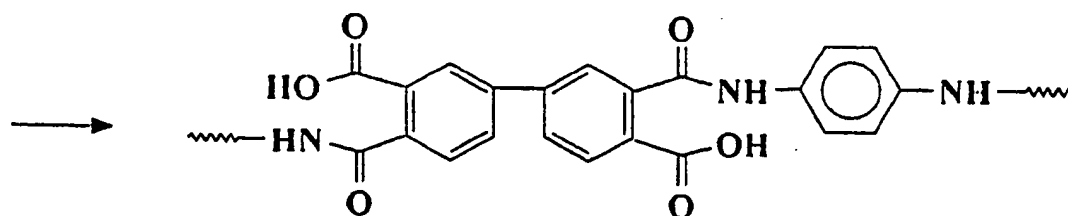


+

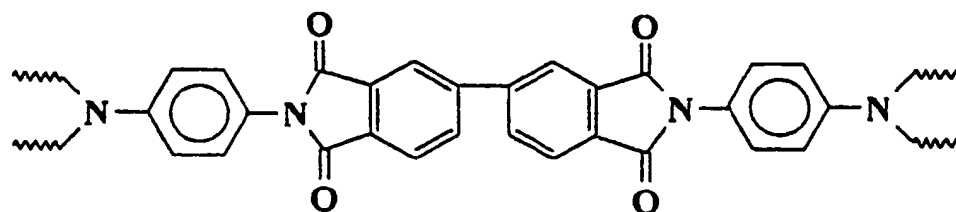


3,3',4,4'-Biphenyltetracarboxylic-Dianhydrid
(BPDA)

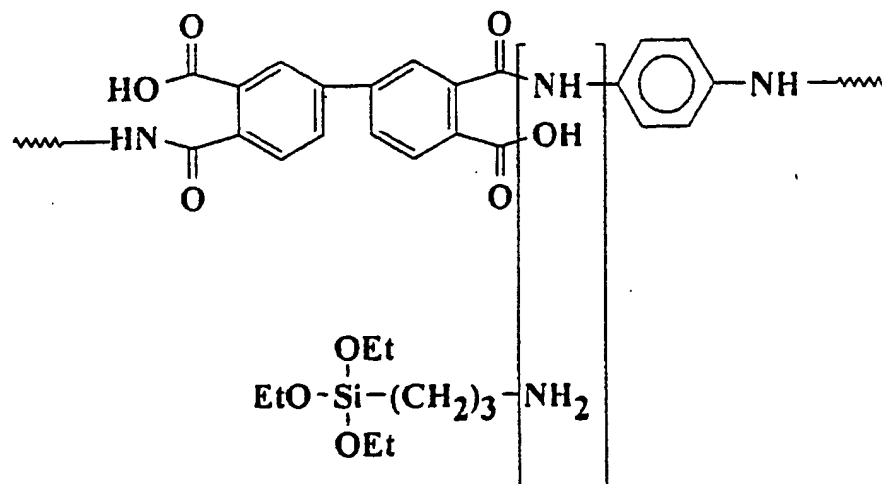
p-Phenyldiamin
(pPD)



200°C
→
H₂O



Anbinden des Polyimids an die Substratoberfläche



Aminopropyl-triethoxy-Silan (APTES)

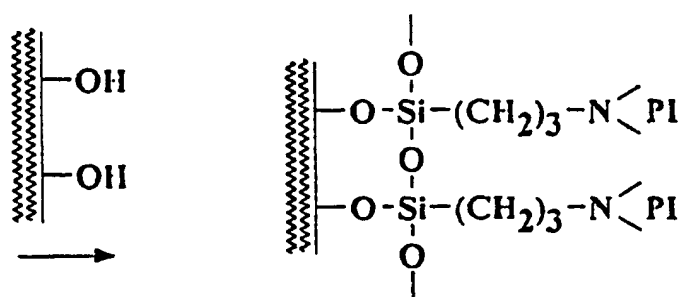
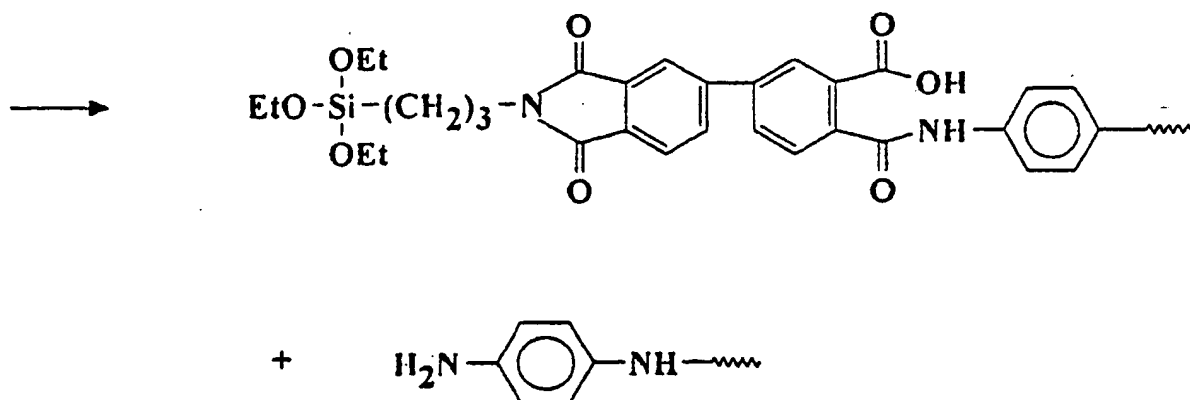
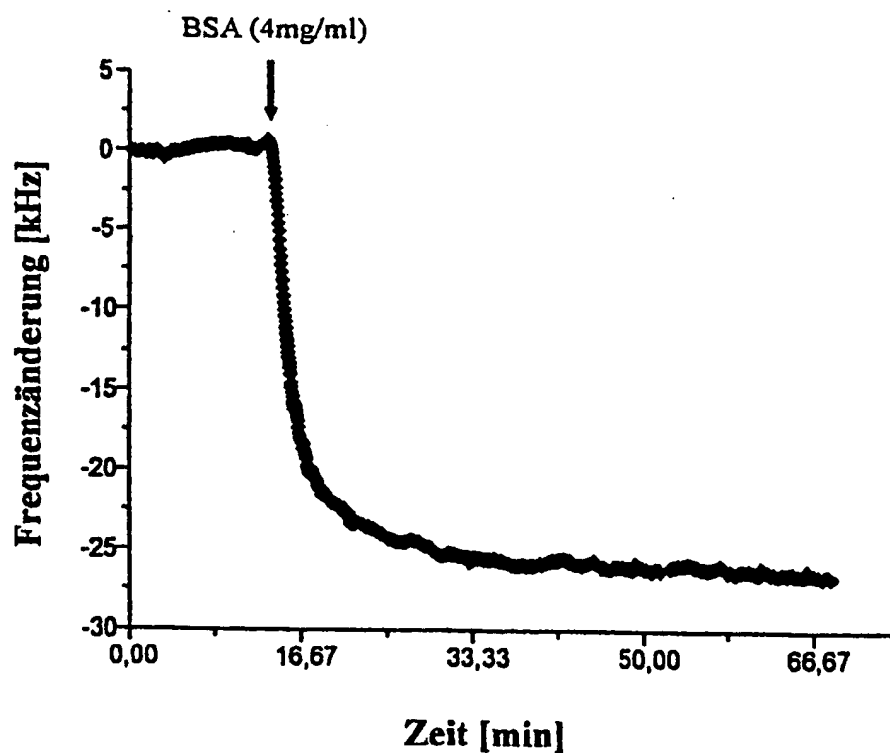
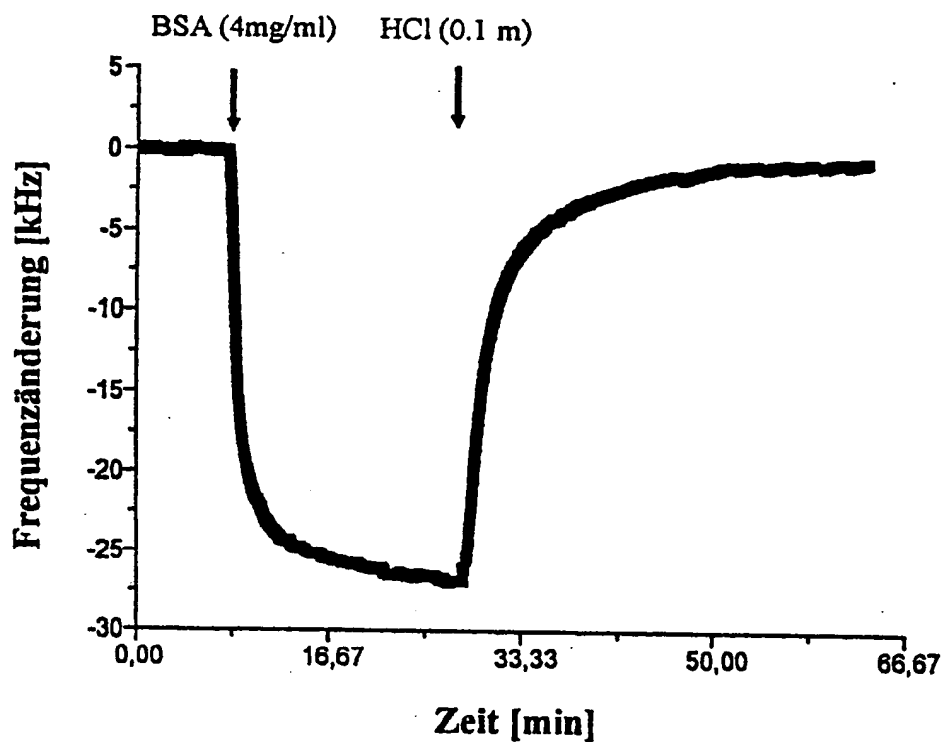


Fig. 2

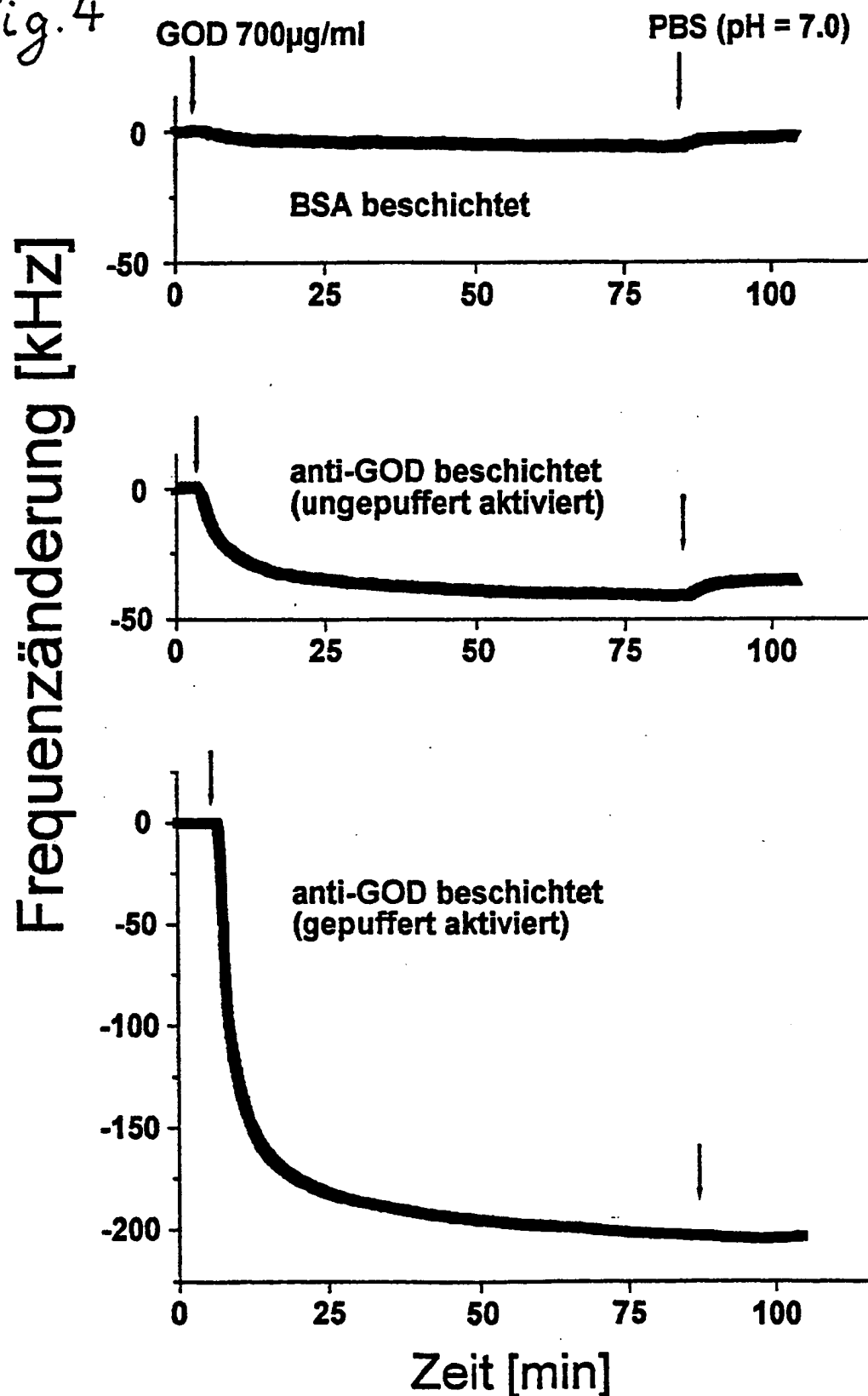
Passivierung mit Polyimid

Fig. 3



Immunoreaktion

Fig. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.